

PCT/JP 2004/006583

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

10.5.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年11月 7日
Date of Application:

出願番号 特願2003-378602
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2003-378602]

出願人 大阪府
Applicant(s):

REC'D 01 JUL 2004

WIPO

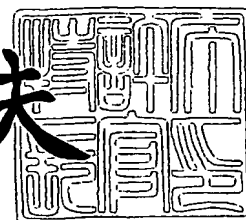
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 6月11日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3050437

【書類名】 特許願
【整理番号】 POF-11344
【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特許出願
【提出日】 平成15年11月 7日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12Q 1/68
C12N 15/10

【発明者】
【住所又は居所】 大阪府堺市大野芝町 2 3 府大宅舎 4 - 1 1 8
【氏名】 長岡 勉

【発明者】
【住所又は居所】 大阪府堺市深井水池 2 8 6 2 ベルエポック I - B
【氏名】 椎木 弘

【特許出願人】
【識別番号】 000205627
【氏名又は名称】 大阪府

【代理人】
【識別番号】 100065248
【弁理士】
【氏名又は名称】 野河 信太郎
【電話番号】 06-6365-0718

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 014203
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

微小白金くし型電極上に、金ナノ粒子の膜が形成され、
金ナノ粒子の膜がさらにDNAプローブで修飾されてなる電気抵抗型DNA検出センサ。

【請求項 2】

金ナノ粒子の膜が金ナノ粒子同士および／または金ナノ粒子と電極との結合で形成され、
1, 10-デカンジチオールを介して行われる請求項 1 に記載の電気抵抗型DNA検出センサ。

【請求項 3】

DNAプローブが、末端がSH化された一本鎖DNAである請求項 1 または 2 に記載の電気抵抗型DNA検出センサ。

【請求項 4】

表面に形成された複数の微細な凹部を有する基板と、各凹部の内部表面に形成された金ナノ粒子の膜と、金ナノ粒子の膜に電気的に接続するように形成された第 1 及び第 2 電極とを備え、
金ナノ粒子の膜が、プローブで修飾されてなる電気抵抗型検出センサ。

【請求項 5】

表面に形成された複数の微細な凹部を有する基板と、各凹部の内部表面に形成された金ナノ粒子の膜と、金ナノ粒子の膜に電気的に接続するように形成された第 1 及び第 2 電極とを備え、

第 1 電極が、基板の表面に形成され、第 2 電極が、凹部の内部に形成され、金ナノ粒子の膜が、プローブで修飾されてなる電気抵抗型検出センサ。

【請求項 6】

第 1 及び第 2 電極の何れか一方が、互いに電気的に接続される請求項 4 または 5 に記載の電気抵抗型検出センサ。

【請求項 7】

複数の凹部が、複数の行及び列からなるマトリックス状に並び、各行の第 1 電極及び各列の第 2 電極が、それぞれ互いに電気的に接続される請求項 5 に記載の電気抵抗型検出センサ。

【請求項 8】

凹部が、すり鉢形状である請求項 4 ～ 7 のいずれか 1 つに記載の電気抵抗型検出センサ。

【請求項 9】

金ナノ粒子同士および／または金ナノ粒子と電極との結合が、1, 10-デカンジチオールを介して行われる請求項 4 ～ 8 のいずれか 1 つに記載の電気抵抗型検出センサ。

【請求項 10】

プローブが、その末端でSH基又はNH₂基で活性化されている請求項 4 ～ 9 のいずれか 1 つに記載の電気抵抗型検出センサ。

【請求項 11】

プローブが、一本鎖DNAである請求項 4 ～ 10 のいずれか 1 つに記載の電気抵抗型検出センサ。

【書類名】明細書

【発明の名称】電気抵抗型検出センサ

【技術分野】

【0001】

本発明は、DNAあるいはRNAのような核酸、抗原あるいは抗体のようなタンパク質、またはガスなどの標的物質の電気抵抗型検出センサに関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、特開2003-287538（特許文献1）や、特開2003-250088（特許文献2）などに記載のような多くのDNAチップが開発されている。そして、従来のチップでは、蛍光物質でラベルされた一本鎖DNAに、相補的なDNAをハイブリダイゼーションさせることで蛍光を生じさせ、それを顕微鏡やレーザー蛍光スキャナーを使って読み取り、チップ上の蛍光の位置から、相補的なDNAの存在を検出している。しかし、この技術では、基板上へのDNAの非特異的な吸着が無視できず、さらにオリゴヌクレオチドプローブの固定化法が十分確立しておらず、また固定化量の制御方法も確立していない。さらに、DNAの存在の検出に、適当な蛍光ラベル化剤やインターカラーターを導入する必要がある、またレーザー蛍光スキャナーなどの大掛かりな装置が必要であり、コストの面や操作の煩雑さの面で不十分であった。

【特許文献1】特開2003-287538

【特許文献2】特開2003-250088

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

そこで本発明は、上記のような問題点、つまりDNAあるいはRNAのような核酸、抗原あるいは抗体のようなタンパク質、またはガスなどの標的物質を従来よりも簡易で安価に精度よく電気的に検出、確認する装置と方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0004】

かくして、本発明の第1の観点によれば、

微小白金くし型電極上に、金ナノ粒子の膜が形成され、

金ナノ粒子の膜がさらにDNAプローブで修飾されてなる電気抵抗型DNA検出センサが提供される。

さらに、本発明の第2の観点によれば、

表面に形成された複数の微細な凹部を有する基板と、各凹部の内部表面に形成された金ナノ粒子の膜と、金ナノ粒子の膜に電気的に接続するように形成された第1及び第2電極とを備え、

金ナノ粒子の膜が、プローブで修飾されてなる電気抵抗型検出センサ、および

表面に形成された複数の微細な凹部を有する基板と、各凹部の内部表面に形成された金ナノ粒子の膜と、金ナノ粒子の膜に電気的に接続するように形成された第1及び第2電極とを備え、

第1電極が、基板の表面に形成され、第2電極が、凹部の内部に形成され、金ナノ粒子の膜が、プローブで修飾されてなる電気抵抗型検出センサが提供される。

【発明の効果】

【0005】

本発明は、上記の電気抵抗型検出センサを用いることで、標的物質の有無を検出するのに、蛍光物質などの特殊な試薬や、複雑な装置を用いることなく、容易で、迅速に、そして安価で、かつコンパクトに、標的物質を精度よく電気的に検出、確認することができるという効果を有している。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

本発明は、
微小白金くし型電極上に、金ナノ粒子の膜が形成され、
金ナノ粒子の膜がさらにDNAプローブで修飾された電気抵抗型DNA検出センサを用い、これに被検体を接触させ、電気抵抗値を測定することにより、被検体中のDNAの種類を検出、確認することができる。

さらに、金ナノ粒子の膜が金ナノ粒子同士および／または金ナノ粒子と電極との結合を、1, 10-デカンジチオールを介して行うことで、より確実に被検体のDNAの存在を検出、確認することができる。

【0007】

さらに、本発明は、
表面に形成された複数の微細な凹部を有する基板と、各凹部の内部表面に形成された金ナノ粒子の膜と、金ナノ粒子の膜に電氣的に接続するように形成された第1及び第2電極とを備え、

金ナノ粒子の膜が、プローブで修飾され、少なくとも一方の電極及び／又は他の金ナノ粒子に接続されてなる電気抵抗型検出センサを用いることにより、各凹部にそれぞれ別のプローブを結合させ、簡便に短い時間で、被検体中の物質を電氣的に検出、確認することができる。

【0008】

本発明で標的とする物質としては、DNAあるいはRNAのような核酸、抗原あるいは抗体のようなタンパク質、またはガスなどが挙げられる。

本発明の「基板」には、絶縁性を有するものを好適に用いることができ、材料としては、例えばガラス、プラスチック、水晶またはシリコンなどが挙げられる。

【0009】

さらに本発明の基板の表面には、複数の微細な凹部が形成されている。

本発明の「凹部」とは、反応部を構成し、その内部に金ナノ粒子の膜を形成させ、さらに金ナノ粒子の膜をプローブで修飾でき、プローブと被検体とが反応しうる大きさと形状を備えていれば特に限定されない。

さらに、1つの基板上の凹部の数は、プローブの種類により適宜決めることができる。
例えば基板の大きさを $1\text{cm}^2 \sim 3\text{cm}^2$ とした場合、凹部の数は100～3000である。

さらに、凹部の形状は、丸や多角形の筒状であってもよく、すり鉢状の形状であってもよい。なかでもすり鉢状の形状であることが好ましい。換言すれば、凹部は、その底部が開口部より小さな面積を有するのが望ましい。

【0010】

また凹部を形成する方法は、基板の材料や、凹部の大きさや形状に従って、それ自体公知の手法から選択することができる。例えば、ガラス基板やプラスチック基板を用いた場合、所定の形状のパターンを有するマスクを用い、化学的エッチング剤を用いるか、レーザー光を用いるかして凹部を形成することができる。

なお、あらかじめ凹部の部分を形成したシートを、ラミネートなどによって基板に装着させることで凹部を形成してもよい。

【0011】

さらに、本発明の電気抵抗型検出センサでは、上記各凹部と接触するように、第1電極と第2電極が設けられている。例えば凹部の一方の肩部に第1電極を設け、他方の肩部または凹部の底部に第2電極を設けることができる。

さらには、各凹部に対応する第1または第2電極は、互いに電氣的に接続されてもよい。

上記「第1電極」および「第2電極」の材料は、特に限定されず、Au、Pt、Cu、Al、Ni、Tiなどの金属、又はこれらの合金などを用いることができる。そして、それらの材料を蒸着や、めっきなどを行うことで電極を形成することができる。第1及び第2電極は絶縁材料等で被覆されていてもよい。

具体的には、所定のパターンを有するマスクを用いて第1電極を形成する金属膜を蒸着

させ、同様に第2電極を形成する金属膜を蒸着させることで形成することができる。
また、上記電極を形成する工程と凹部を形成する工程とはどちらを先に行ってもよい。

【0012】

さらに、上記凹部の内表面には、金ナノ粒子の膜が形成されている。

本発明の「金ナノ粒子の膜」とは、金ナノ粒子同士が結合またはナノギャップで存在するものを意図する。ある観点によれば、金ナノ粒子の層として表現できる。

また、本発明の「金ナノ粒子同士および／または金ナノ粒子と電極との結合」とは、金ナノ粒子同士および／または金ナノ粒子と電極とを結合させることを含み、電極に用いる材料や検出条件に応じて、直接結合させてもよく、さらには結合剤を介して結合させてもよい。

【0013】

「結合剤」の例としては、電極として白金電極を用い、検出対象をDNAとした場合、1, 10-デカンジチオールなどのSH基を有するものや、1, 10-ジアミノデカンなどのNH₂基を有するものが挙げられ、好ましくは1, 10-デカンジチオールである。

また、各凹部の内表面への金ナノ粒子の膜の形成は、例えば金ナノ粒子と金ナノ粒子の結合剤を含有する金コロイド溶液を凹部に注入することにより行うことができる。

金ナノ粒子の膜を凹部の内表面に形成するに当たっては、i) 凹部に結合剤（例えば1, 10-デカンジチオール）のアルコール溶液を接触させ、次いで金ナノ粒子のコロイド液（例えば水中またはアルコール中）と接触させ、ii) 凹部に、結合剤と金ナノ粒子を含有するコロイド液を接触させることにより行うことができる。

金ナノ粒子としては、通常直径50～100nmのものが使用でき、またアルコールとしてはメタノール、エタノールなどが挙げられる。

【0014】

上記の金ナノ粒子の膜は、さらにプローブにて修飾されている。

本発明の「プローブで修飾する」とは、金ナノ粒子の膜および／または電極に、プローブを接続させることを含む。

本発明の「プローブ」とは、標的物質と相補的に会合または結合することで金ナノ粒子の膜の電気抵抗を変化させることができるものを意図する。そのため、検出目的に応じて適宜選択することができ、具体的にはDNAあるいはRNAのような核酸、抗原あるいは抗体のようなタンパク質、またはガスなどが挙げられる。つまり、DNAを検出対象とする場合、プローブは、そのDNAと相補的な一本鎖を用い、抗原または抗体を検出対象とする場合には、プローブは、目的とする抗原または抗体に結合できる抗体または抗原を有するものを意図する。

なお、このプローブは、末端に活性部位（例えばSH基、NH₂基）を有するものが好ましい。

そして、各凹部ごとに異なる種類のプローブの溶液を注入することで、各凹部内表面に形成されている金ナノ粒子の膜を異なる種類のプローブで修飾させることができる。なお、複数の凹部を同じ種類のプローブで修飾してもよい。

【0015】

さらに本願発明の電気抵抗型検出センサは、以下のような構成をとることも好ましい。

第1及び第2電極は、1又は複数のマルチプレクサ、好ましくはアナログマルチプレクサを介して接続することができる。マルチプレクサは、ここではデマルチプレクサとして機能する。マルチプレクサには、外部からのアドレス信号に基づいて、対象とするセンサを切り替える機能を有する素子が含まれ、例えば、入力端子、出力端子、アドレス信号を入力するアドレス入力端子を有するものを用いることができる。アドレス入力端子には、アドレス信号を出力するマイクロコンピュータなどの制御部が接続されていることが好ましい。

【0016】

1又は複数のマルチプレクサを介して接続される第1電極と第2電極は、電極間電圧、電流又は抵抗などの電気的特性を測定する電圧測定器、電流測定器又は抵抗測定器などの

電気的特性測定器をさらに介して接続されることが好ましい。

また、第1電極と第2電極は、電気的特性測定器の代わりにロックインアンプ回路を介して接続されてもよい。また、電気的特性測定器は、ロックインアンプ回路の出力端子に接続されてもよい。この場合、周期的電圧変化の同期成分をロックインアンプで検出することで測定環境において発生する雑音特性をカットまたは減少させることができ、電気信号(電圧)の高感度化が可能になる。

【0017】

電気的特性測定器は、測定した電気的特性の大きさに応じた電流、電圧などを出力する出力端子を備えていることが好ましく、また、この出力端子に制御部が接続されていることが好ましい。電気的特性測定器の代わりにロックインアンプ回路が用いられる場合、制御部は、ロックインアンプ回路の出力端子に接続されていることが好ましい。制御部は、メモリなどの記憶部を有し、電気的特性測定器の出力を記憶する構成とすることが好ましい。

制御部は、さらにモニタ又はプリンタなどの出力機器に接続されていることが好ましく、記憶部に記憶した電気的特性を出力機器に出力する構成とすることが好ましい。

【0018】

さらに本発明は、別の観点から見ると、表面に形成された複数の凹部を有する基板と、各凹部の内部表面に形成された金ナノ粒子の膜と、金ナノ粒子の膜に電気的に接続するように形成された第1及び第2電極とを備え、第1電極が、基板表面に形成され、第2電極が、凹部の内部に形成され、金ナノ粒子の膜が、プローブで修飾される検出センサも権利の範囲内にある。

凹部、基板、金ナノ粒子の膜、電極、プローブの種類などについては、先で述べたものを適用することができる。

各凹部に対応する第1または第2電極は、互いに電気的に接続されてもよい。この場合、第2の実施の形態と同様の構成により、各凹部に導入された被検体についての測定を行うことができる。

【0019】

「第1電極が、基板表面に形成され」には、基板表面に形成された第1電極が、絶縁材料等で被覆されている場合も含む。

第2電極は、裏面に露出してもよい。また、第2電極が裏面に露出する場合、第2電極は、その全部又は一部が、さらに絶縁材料等で被覆されてもよい。

第2電極は、基板裏面に互いに交差しない、好ましくは平行に延びる複数の溝を形成し、白金などの導電体で溝を埋めるようにして形成することができる。また、第1の基板に貫通孔を形成し、互いに交差しない、好ましくは、平行に延びる複数の電極を有する第2の基板を、第1の基板の裏面に貼り付けることによって第2電極を形成してもよい。

さらに、複数の凹部が、複数の行及び列からなるマトリックス状に並び、各行の第1電極及び各列の第2電極が、それぞれ互いに電気的に接続されることが好ましい。

マトリックスの行及び列は、直角に交わるのが好ましいが、所望の角度で交わっていてもよい。また、行及び列は、直線状であっても曲線状であってもよい。

【0020】

第1電極の各列及び第2電極の各行を、それぞれマルチプレクサに接続することができ、マルチプレクサに与えるアドレス信号を順次変化させることにより、マトリックス状に並んだそれぞれの凹部について、センサの出力を測定することができる。

マルチプレクサ、制御部、電気的特性測定器、ロックインアンプ回路、出力機器などについては、先で述べたものを適用することができる。

このような構成にすることにより、省スペースで、簡易に、多くの測定を行うことができるという利点を有している。

【0021】

そして、上記のような構成を有する本願の電気抵抗型検出センサの基板上の少なくとも凹部内のプローブで修飾された金ナノ粒子の膜と、被検体とを反応させ、プローブに標的

物質が相補的に会合または結合した場合の抵抗値と、しなかった場合の抵抗値の変化から被検体中の標的物質の種類を電気的に検出、確認することができる。

【0022】

つまり、被検体中にプローブと相補的に会合、結合する物質（標的物質）が存在しない場合には、金ナノ粒子間の電流は、粒子間の結合を通して流れる。それに対し、標的物質が被検体中に存在する場合には、標的物質がプローブと相補的に会合、結合することで、電流はプローブを介して流れる。その結果、抵抗値の違いが生じる。そして、そのことを利用して標的物質の種類を電気的に検出、確認することができる。

【0023】

本発明の被検体の量は、少なくとも基板上の凹部内の金ナノ粒子の膜に接触させることができるができれば特に限定されない。

また、反応させる条件は、用いたプローブや被検体に応じて適宜選択することができる。

。

【実施例1】

【0024】

微小くし型電極を1、10-デカンジチオール/エタノール溶液次いで金コロイド溶液に浸漬して電極上に金ナノ粒子の膜を作製した。この膜に、5'末端SH化DNA (SEQ 1: 5'-TCTCAACTCGTA-3') 水溶液を5 μ l滴下し、30分間放置することにより金ナノ粒子の膜をプローブDNAで修飾した。

次にTE bufferを1 μ l滴下して金ナノ粒子の膜を湿らせ抵抗が安定するまで放置した。そしてサンプルDNAを5 μ l滴下した。

【0025】

図1は、プローブとして12 bspのSEQ 1の遺伝子を用い、SEQ 2の遺伝子(2:1 bspが相補的な一本鎖DNA)、SEQ 3の遺伝子(3:8 bspが相補的な一本鎖DNA)、SEQ 4の遺伝子(4:11 bspが相補的な一本鎖DNA)、SEQ 5の遺伝子(5:12 bspの全てが相補的な一本鎖DNA)を用いて、それらの抵抗値の変化を示したものである。その結果、図1に示すように、プローブDNAを修飾した金ナノ粒子膜にサンプルDNAをそれぞれ滴下すると同時に電気抵抗は減少し、1分程度で安定した。相補DNAを滴下したとき最も大きな抵抗変化がみられた($5.16 \times 10^{-2} \Omega \text{cm}$)。一方、ミスマッチDNAでは、 $2.40 \times 10^{-2} \Omega \text{cm}$ (4)、 $1.44 \times 10^{-2} \Omega \text{cm}$ (3)、 $1.39 \times 10^{-2} \Omega \text{cm}$ (2)の変化にとどまった。4と2との抵抗値の差は $1.01 \times 10^{-3} \Omega \text{cm/base}$ であるのに対し、相補鎖DNA (5)との間では、 $2.76 \times 10^{-2} \Omega \text{cm/base}$ の顕著な変化がみられた。このことは、本発明の検出方法が優れた感度を有していることを証明している。

【実施例2】

【0026】

図2は、本発明の実施例2に係る電気抵抗型検出センサ51を示す。本発明の実施例2に係る電気抵抗型検出センサ51は、基板54表面に形成された複数の凹部53を備えており、各凹部53の内部表面には、金ナノ粒子の膜57が形成されている。また、第1及び第2電極55、56が、各凹部53の金ナノ粒子の膜57に電気的に接続するように形成されている。電気抵抗型検出センサ51は、以下の方法によって製造される。

【0027】

電極の形成及び洗浄

まず、基板に互いに平行に延びる複数本の白金電極を形成する。白金電極は、白金電極を形成する場所以外の場所をマスクした状態で、白金を蒸着する等により形成することができる。次に、図2に(a)に示すように、白金電極を二分するように、各電極の中央部に1つずつ凹部を形成する。白金電極が凹部により分断され、第1及び第2電極が形成される。凹部の形成後、以下の方法により、白金電極の洗浄を行う。

まず、上記白金電極を、0.1Mの H_2SO_4 中で、参照極として Ag/AgCl を用い、対極として白金コイル(ニラコ社製)を用いて、掃引速度200mV/s、掃引範囲-0.25~+1.3Vで、サイクリックボルタモノグラムにて洗浄する。この操作を、電極間の抵抗値が $1.2 \times 10^{10} \Omega$ 以上

になるまで繰り返す。電気化学的な洗浄は、ポテンシostat (セイコーEG&G社製263A-1) を用いて行う。

【0028】

金ナノ粒子の膜の形成

次に、金ナノ粒子の膜の形成方法について説明する。

まず、6mlの1%テトラクロロ金(III)酸四水和物(和光純薬)水溶液と、10mlの3%クエン酸(片山化学)水溶液を含む200mlの水溶液を、80℃で20分間攪拌し、金コロイド溶液を調製する。

次に、凹部に5mMの1, 10-デカンジチオールを含むエタノール溶液を注入し、エタノールが蒸発した後、エタノールで軽くすすぐ。次に、凹部に金コロイド溶液を注入することにより、凹部表面に金ナノ粒子膜が形成される。

このようにして金ナノ粒子の膜を形成することにより、第1及び第2電極55、56が、各凹部53の金ナノ粒子の膜57に電気的に接続される。

【0029】

DNAプローブでの修飾

まず、プローブとして、5'末端がチオール化されたDNA(日清紡製)を用いた。

次に、凹部を100μMの上記DNAを含む5μlのTEバッファー(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、1M NaCl)溶液で満たし、30分間放置する。これにより、金ナノ粒子がプローブDNAで修飾される。

次に、余分なチオール化したDNAを除去するため、TEバッファーを用いて金ナノ粒子表面を洗浄し、さらに界面抵抗の影響を取り除くため、1μlのTEバッファーにて金ナノ粒子表面を湿らせる。

【0030】

周辺装置

次に、電気抵抗型検出センサ51に接続される周辺装置等について説明する。

図2に示すように、各凹部53に対応する第1電極55は、マルチプレクサ60の入力端子61に電気的に接続される。また、マルチプレクサ60の出力端子62と各凹部53に対応する第2電極56とが、電気抵抗測定器63を介して、電気的に接続される。電気抵抗測定器63は、その出力端子64から測定した電気抵抗に対応した電圧を出力する。また、マイクロコンピュータ65が、マルチプレクサ60のアドレス入力端子66及び電気抵抗測定器63の出力端子64に接続される。マルチプレクサ60は、ここでは、デマルチプレクサとして機能するため、各凹部53からの複数の出力は入力端子61に入力され、単一の出力端子62から出力される。

【0031】

マイクロコンピュータ65は、順次出力アドレスを変化させ、各凹部53に対する電気抵抗測定器63の出力を記憶する。マイクロコンピュータ65は、プリンタ又はモニタなどの出力機器67に接続されており、記憶したデータを出力機器67に出力する構成となっている。このような構成をとることにより、一度に多くの標的DNAを簡易に検出することができる。

【0032】

標的DNAの検出

次に、本発明の電気抵抗型検出センサ51及びその周辺装置を用いた標的DNAの検出方法について説明する。

まず、電気抵抗型検出センサの凹部53に、100μMのサンプルDNAを含む5μlのTEバッファーを、先に調製した金ナノ粒子表面にまんべんなく滴下し、3分間放置する。そして、デジタルマルチメーター(HEWLETT PACKARD社製 34401A型)63を用いて、22±1℃で電極の両端の電気抵抗を測定する。

【実施例3】

【0033】

図3は、実施例3に係る電気抵抗型検出センサの構成を示すブロック図である。実施例

3に係る電気抵抗型検出センサでは、マルチプレクサ60の出力端子62と各凹部53に対応する第2電極56とが、ロックインアンプ回路68を介して、電氣的に接続される。ロックインアンプ回路68の出力端子69が、マイクロコンピュータ65に接続される。その他の構成や金ナノ粒子の形成方法などは、実施例2と同様である。

【0034】

図4は、実施例3に係るロックインアンプ回路68の構成を示すブロック図である。Aは加算器、Bは図3の点線で示す電気抵抗型検出センサ、Cは電流電圧変換器、Dはロックインアンプ、Eはバイアス電圧、Fは同期信号である。信号Fに同期する出力成分をロックインアンプで選択的に検出することで測定環境において発生する雑音特性をカットまたは減少させることが出来る。

【実施例4】

【0035】

図5に本発明の実施例4に係る基板上に上記の電気抵抗型検出センサを複数個備えた電気抵抗型検出センサ71を示す。電気抵抗型検出センサ71は、複数の行X及び列Yからなるマトリックス状に並んだ複数の凹部73を備える。

【0036】

さらに、各凹部73の内部表面には、金ナノ粒子の膜77が形成されている。また、第1及び第2電極75、76が、各凹部73の金ナノ粒子の膜77に電氣的に接続するように形成されている。また、電極75は凹部73の基盤74表面にリングあるいはそれに類似する形に作製されてもよい。

【0037】

第1電極75は、基板74表面に形成され、第2電極76は、凹部73の内部に形成されると共に基板74の裏面に露出している。また、各行Xの第1電極75及び各列Yの第2電極76は、それぞれ互いに電氣的に接続されている。

【0038】

電極及び金ナノ粒子の膜の形成

次に、このような電極75、76及びこれらに電氣的に接続する金ナノ粒子の膜77の形成方法について説明する。

まず、基板裏面に互いに平行に延びる複数の溝を形成し、溝を埋めるようにして白金で第2電極76を形成する。

次に、図5(a)で示すような形状で第1電極75を形成する。

次に、基板74表面から第2電極76に対向するように、マトリックス状に並んだ複数の凹部73を形成する。凹部73は、第2電極76が基板74表面側に露出する深さに形成する。

最後に、実施例2で用いたのと同様の方法により、凹部73の内部表面に金ナノ粒子の膜77を形成し、電極及び金ナノ粒子の膜の形成を完了する。

【0039】

DNAプローブでの修飾

次に、実施例2で用いたのと同様の方法により、金ナノ粒子の膜77をDNAプローブで修飾する。

【0040】

周辺装置

次に、電気抵抗型検出センサ71に接続される周辺装置等について説明する。

図5に示すように、第1電極75の各列Y及び第2電極76の各行Xは、それぞれマルチプレクサ80、81の入力端子82、83に接続される。各マルチプレクサ80、81の出力端子84、85は、電気抵抗測定器86を介して、互いに電氣的に接続される。電気抵抗測定器は図4に示すようなロックインアンプ回路68を使用してもよい。電気抵抗測定器86は、その出力端子87から測定した電気抵抗に対応した電圧を出力する。また、マイクロコンピュータ88が、各マルチプレクサ80、81のアドレス入力端子89、90及び電気抵抗測定器86の出力端子87に接続されている。

【0041】

さらにマイクロコンピュータ88は、各マルチプレクサ80、81に対する出力アドレスを順次変化させて出力し、二次元アレイ状に並んだ凹部73を走査し、各凹部73に対する電気抵抗測定器86の出力を記憶する。マイクロコンピュータ88は、プリンタ又はモニタなどの出力機器91に接続されており、記憶したデータを出力機器91に出力する構造となっている。

【0042】

このような構成とすることにより、一度にさらに多くの標的DNAを検知することができる。また、第1電極を基板表面に配置し、第2電極を基板裏面に配置するという構造をとることで、高密度にセンサを配置することができ、装置の省スペース化を図ることもできる。

【0043】

標的DNAの検出

実施例4の電気抵抗型検出センサ71及びその周辺装置を用いて、実施例2で用いたのと同様の方法により、標的DNAの検出を行うことができる。

【産業上の利用可能性】

【0044】

本発明の方法を用いることで、従来よりも簡易に感度よく、低コストで、DNAあるいはRNAのような核酸、抗原あるいは抗体のようなタンパク質、またはガスなどの標的物質を、効率よく電気的に検出、確認することができた。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】プローブとして12bspのSEQ1の遺伝子を用い、SEQ2の遺伝子(2:1bspが相補的な一本鎖DNA)、SEQ3の遺伝子(3:8bspが相補的な一本鎖DNA)、SEQ4の遺伝子(4:11bspが相補的な一本鎖DNA)、SEQ5の遺伝子(5:12bspの全てが相補的な一本鎖DNA)を用い、それらの抵抗値の変化を示したもの。

【図2】(a)は、本発明の実施例1に係る電気抵抗型検出センサの構成を示すブロック図である。(b)は、電気抵抗型検出センサの凹部の状態を示す要部側面断面図である。

【図3】本発明の実施例2に係る検出センサの構成を示すブロック図である。

【図4】本発明の実施例2に係るロックインアンプ回路の構成を示すブロック図である。

【図5】(a)は、本発明の実施例2に係る検出センサの構成を示すブロック図である。(b)は、検出センサの凹部の状態を示す要部側面断面図である。

【符号の説明】

【0046】


- 2: サンプルとして、1bspが相補的な一本鎖DNA (SEQ No2) を用いたときの抵抗値
- 3: サンプルとして、8bspが相補的な一本鎖DNA (SEQ No3) を用いたときの抵抗値
- 4: サンプルとして、11bspが相補的な一本鎖DNA (SEQ No4) を用いたときの抵抗値
- 5: サンプルとして、12bspの全てが相補的な一本鎖DNA (SEQ No5) を用いたときの抵抗値

【0047】

- 51、71: 電気抵抗型検出センサ
- 53、73: 基板の凹部
- 54、74: 基板
- 55、75: 第1電極
- 56、76: 第2電極

【0048】

- 57、77: 金ナノ粒子の膜
- 60、80、81: マルチプレクサ

- 
- 61、82、83：マルチプレクサの入力端子
 - 62、84、85：マルチプレクサの出力端子
 - 63、86：電気抵抗測定器
 - 64、87：電気抵抗測定器の出力端子
 - 65、88：マイクロコンピュータ
 - 66、89、90：マルチプレクサのアドレス入力端子
 - 67、91：出力機器
 - 68：ロックインアンプ回路
 - 69：ロックインアンプ回路の出力端子
 - X：行
 - Y：列

【配列表】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Osaka Prefecture University

<120> Electric resistance type detective sensor

<130> POF-11344

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

TCTCAACTCG TA

1 10

<210> 2

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

CCCCCCCCCC CC

1 10

<210> 3

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

AGAGTTAACT CT

1 10

<210> 4

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

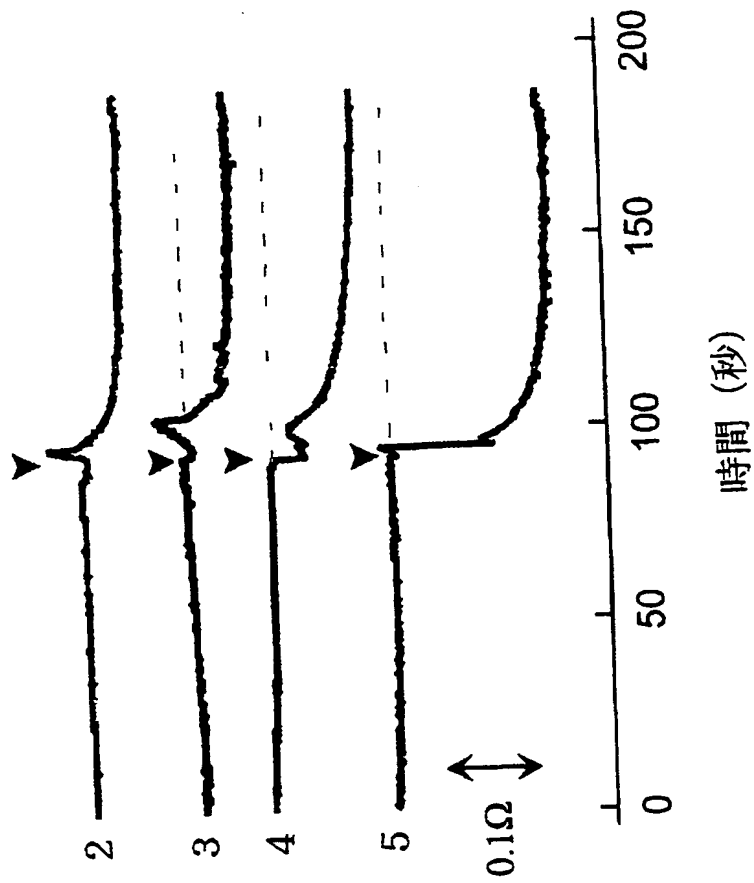
AGAGTTGAGC CT

1 10

<210> 5
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

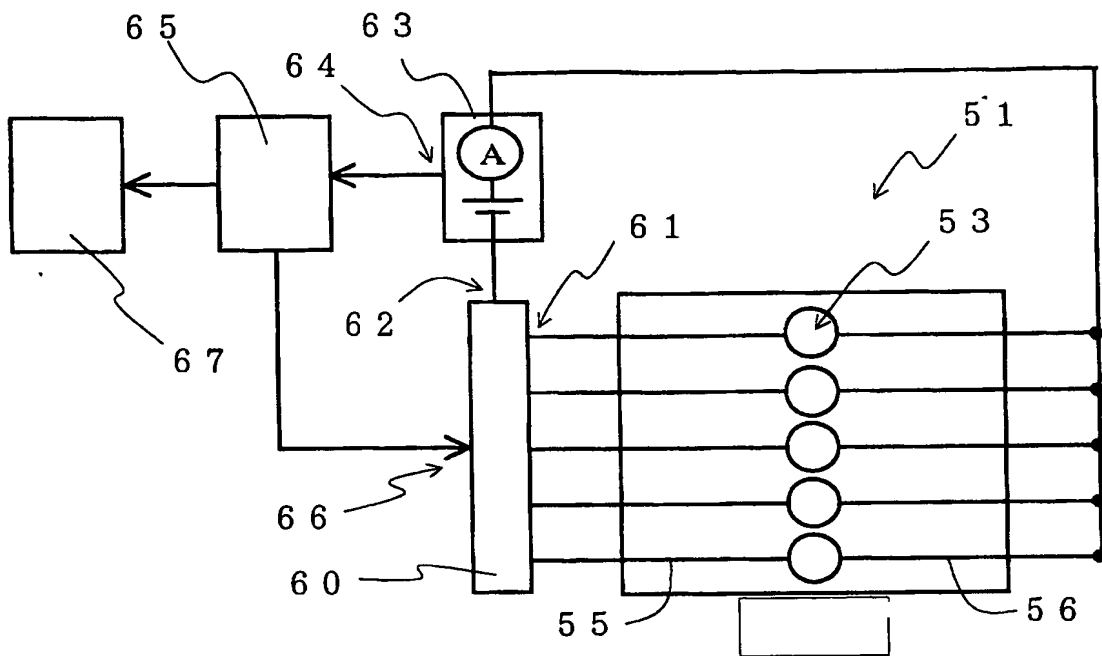
<400> 5
AGAGTTGAGC AT
1 10

【書類名】 図面
【図 1】

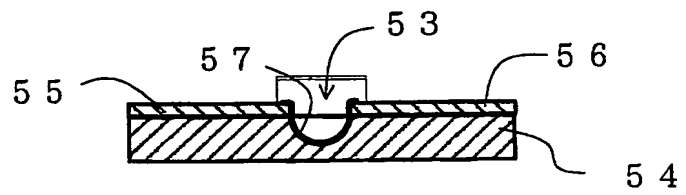


【図 2】

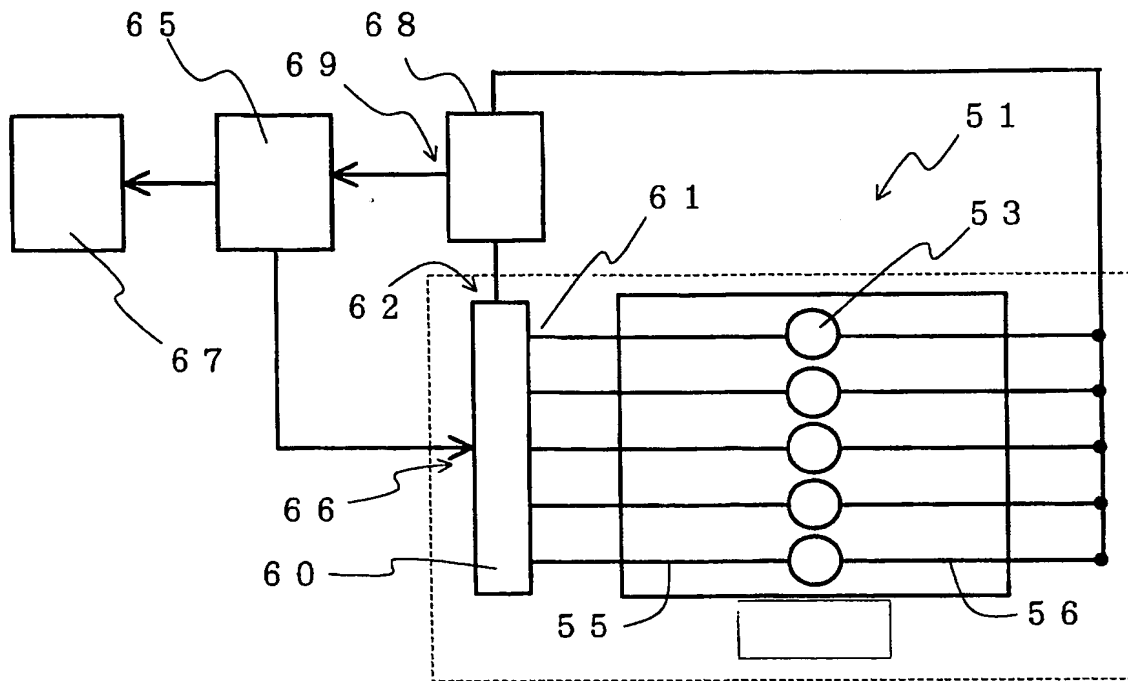
(a)



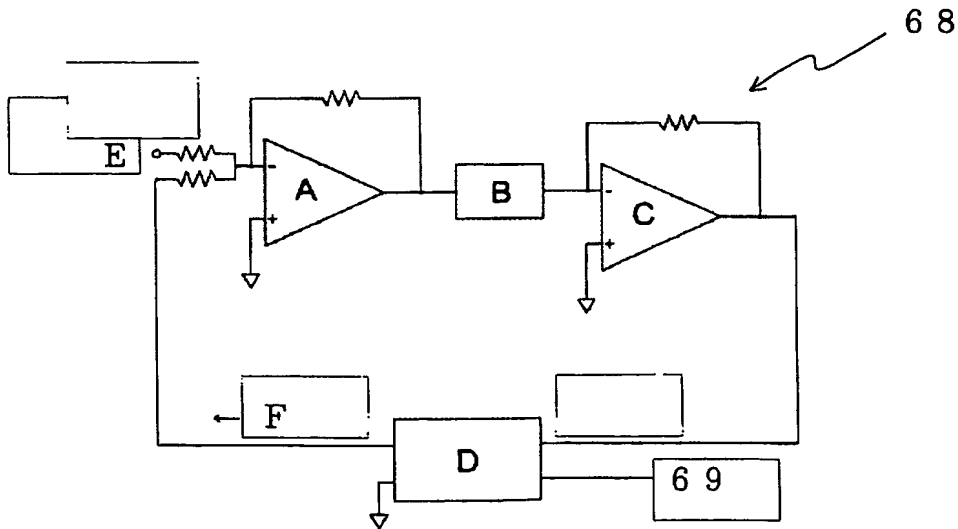
(b)



【図 3】

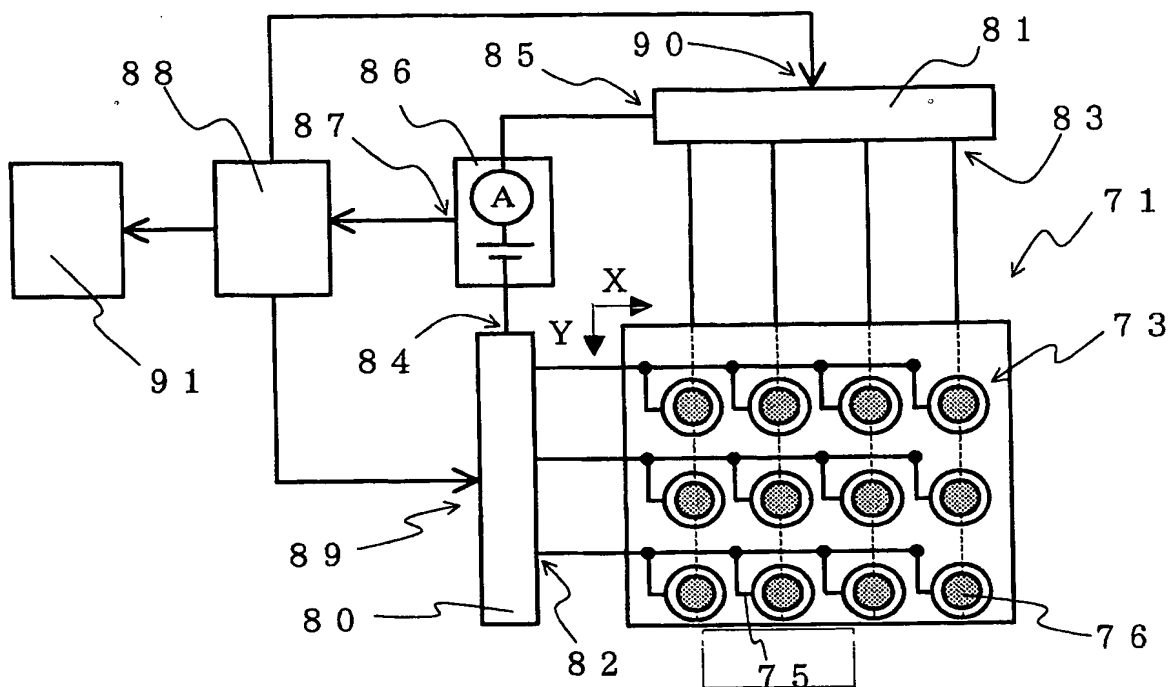


【図 4】

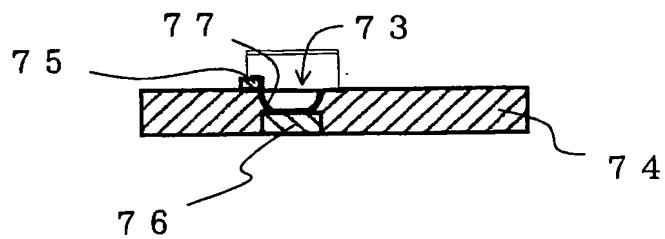


【図 5】

(a)



(b)



【書類名】要約書

【要約】

【課題】DNAあるいはRNAのような核酸、抗原あるいは抗体のようなタンパク質、またはガスなどの標的物質を従来よりも簡易で安価に精度よく検出、確認する装置と方法を提供することを課題とする。

【解決手段】上記課題を、

微小白金くし型電極上に、金ナノ粒子の膜が形成され、
金ナノ粒子の膜が、金ナノ粒子同士および／または金ナノ粒子と電極との結合で形成され、
金ナノ粒子の膜がさらにDNAプローブで修飾されている電気抵抗型DNA検出センサを提供することで解決した。

【選択図】図1

特願 2003-378602

出願人履歴情報

識別番号

[000205627]

1. 変更年月日

1990年 8月31日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中心区大手前2丁目1番22号

氏 名

大阪府